

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ЗАО "ЭКОлаб"

В.Ю.Борисов

"14" 06 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к антигенам рода Кандида»
"ИФА-Кандида-IgM"

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к антигенам рода Кандида» "ИФА-Кандида-IgM" предназначен для выявления видоспецифических антител класса М к антигенам рода Кандида в сыворотке (плазме) крови людей методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Грибы рода *Candida* распространены повсеместно. Они присутствуют на слизистых оболочках рта, желудочно-кишечного тракта, влагалища, не вызывая каких-либо клинических проявлений. При нарушении защитных сил организма и наличии патогенных факторов, связанных с ослаблением организма, угнетением иммунитета, нарушением целостности естественных покровов, побочным действием лекарственных препаратов, сахарным диабетом и т. п., эти грибы могут стать причиной многих заболеваний: молочницы (бактериальный вагиноз), негонорейного уретрита, пневмонии у новорожденных, гнойных заболеваний, стоматита, системного кандидоза (монилиаза).

Серологический тест служит важным дополнением к микробиологическим методам диагностики инвазивного кандидоза.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	Смесь очищенных и инаktivированных антигенов <i>Candida albicans</i> , <i>C. crusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. pseudotropicalis</i> , сорбированная на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном (используются "ломающиеся" стрипы)	1 планшет
<i>допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>		
Контрольный положительный образец (K^+)	инаktivированный, содержит антитела класса М к антигенам рода Кандида; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный образец уровня среза ($K^+_{пор}$)	инаktivированный; содержит антитела класса М к антигенам рода Кандида в "пороговом" титре (1:100); прозрачная жидкость желтого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный отрицательный образец (K^-)	инаktivированный; не содержит антитела класса М к антигенам рода Кандида; прозрачная жидкость зеленого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Конъюгат	антитела моноклональные мышинные против иммуноглобулинов человека класса М, меченые пероксидазой хрена; прозрачная розового цвета жидкость	1 фл. (13 мл)
Блокирующий раствор (БР)	козья сыворотка, содержащая антитела к иммуноглобулинам человека класса G и не содержащая антитела к другим классам иммуноглобулинов человека; прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (7,5 мл)
25-кратный концентрат промывочного раствора с твином PR(x25)	прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °C в течение 30 мин	2 фл. (по 40 мл)
Раствор для предварительного разведения образцов (ВРРА)	прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (15 мл)

...я разведения ЭКОПРО	прозрачная жидкость синего цвета	1 фл. (15 мл)
...твор индикаторный (РИ);	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость.	1 фл. (12,5 мл)

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ПР(х25), РИ, РРО, РПРО, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты.

3. К+, К+пор и К– не содержат HBsAg и антитела к ВГС, ВИЧ 1 и ВИЧ-2.

4. В составе изделия отсутствуют материалы, вступающие в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента и персонала, использующего изделие, при выполнении требований эксплуатационной документации (инструкции по применению).

В составе изделия отсутствуют лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

Набор укомплектован принадлежностями:

вспомогательным планшетом для предварительного разведения образцов (2 шт.),

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),

одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток (16 шт.)

клеякой пленкой для планшетов (4 шт.).

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, принадлежности, паспорт.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации набора позволяет одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 6 лунок и 1 лунка – для выведения уровня "бланк" спектрофотометра). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число иссл. обр.	1	2-9	10-17	18-25	26-33	34-41	42-49	50-57	58-65	66-73	74-81	82-89

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце антител класса М к антигенам рода Кандида они связываются с антигеном, сорбированным на поверхности лунок полистиролового планшета, этот комплекс, в свою очередь, связывается с конъюгатом – антителами против IgM человека, мечеными пероксидазой хрена. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело-конъюгат" выявляется по реакции с субстратом пероксидазы – тетраметилбензидином, в результате которой бесцветное содержимое лунок приобретает голубой цвет, изменение цвета регистрируется по оптической плотности раствора в лунке планшета с помощью спектрофотометра.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка, плазма (с ЭДТА, с гепарином, с цитратом натрия) крови человека объемом не менее 10 мкл.

образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и до 3 месяцев при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-оттаивание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

Сбор биологического материала должен производиться в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований».

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность набора определяется по стандартной панели положительных сывороток предприятия, содержащих иммуноглобулины класса М к антигенам рода Кандида, (СОП⁺-226) как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

Специфичность набора определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, не содержащих иммуноглобулины класса М к антигенам рода Кандида, (СОП-226) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

В результате проведения испытания 1000 образцов биоматериала получены результаты:

Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%) составила:

Сыворотка крови человека-98,51% - 100%

Плазма крови человека-99,01%-100%.

Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%) составила:

Сыворотка крови человека-98,51% - 100%

Плазма крови человека-99,01%-100%.

Диагностическая чувствительность набора (с доверительной вероятностью 95%) составила: 99,40% - 100%

Диагностическая специфичность набора (с доверительной вероятностью 95%) составила: 99,40% - 100%

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил "Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" (Утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003).

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» относится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы).

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Раствор для предварительного разведения образцов (РПРО) и раствор для разведения образцов (ПРО) содержат натрия азид в конечной концентрации 0,95г/л. Данная концентрация является безопасной.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1.Оборудование и материалы (для "ручной" постановки)



заторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с нако-ми полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные-торы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,

Термостат на 37 °С.

Холодильник бытовой.

Фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих. ИФА-анализатор.

2. Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

2.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

2.2. Приготовление рабочего промывочного раствора (ПР)

При выпадении осадка солей в ПР(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При постановках с использованием ИФА-анализаторов 40 мл ПР(х25) довести водой очищенной до 1 л.

При дробной постановке использовать соотношения объемов ПР(х25) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ПР(х25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищенная, мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут

2.3. Подготовка исследуемых образцов

2.3.1. Предварительное разведение исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести в 10 раз в одном из вспомогательных планшетов. Для этого внести в его лунки по 90 мкл РПРО и добавить по 10 мкл сыворотки (плазмы), тщательно перемешать пипетированием. При этом розовый цвет должен измениться на желто-оранжевый.

2.3.2. Приготовление рабочих разведений исследуемых образцов

В лунки другого вспомогательного планшета внести 60 мкл РРО и добавить 75 мкл блокирующего раствора (БР), тщательно перемешать. Добавить 15 мкл **предварительно разведенных** (см. п. Предварительное разведение исследуемых образцов.) в 10 раз образцов в каждую лунку, тщательно перемешать пипетированием и выдержать 30 мин при температуре от 21 до 25 °С.

2.4. Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, К+, К-, К+пор, РРО, БР, РПРО, конъюгат, РИ, стоп-реагент – готовы к применению.

3. Проведение ИФА ("ручная" постановка)

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

3.1. Извлечь из упаковки рамку иммуносорбента и необходимое число стрипов.

3.2. В лунку А1 внести 100 мкл РРО, в следующие лунки внести по 100 мкл контрольных образцов (по 2 лунки на каждый контрольный образец), оставшиеся лунки использовать для исследуемых образцов (по 1 лунке на образец), для чего внести в них: вначале по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл

предварительно разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета (см. п. «Предварительное разведение исследуемых образцов»), тщательно перемешать пипетированием.

3.3. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой, инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25°C в защищенном от света месте..

3.4. С помощью промывателя удалить содержимое лунок, 4 раза промыть планшет промывочным раствором, внося в лунки 350-370 мкл раствора. При наличии промывателя, позволяющего производить промывку в режиме "Overflow", использовать именно этот режим. По окончании промывки остатки раствора удалить из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

3.5. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата.

3.6. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой. Инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25°C в защищенном от света месте.

3.7. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 4 раза промыть планшет, как указано в п. 4.

3.8. Во все лунки внести по 100 мкл раствора индикаторного, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и инкубировать 10–15 мин при температуре от 21 до 25°C.

3.9. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился раствор индикаторный) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 10 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При измерении оптической плотности в обоих случаях вывести спектрофотометр на нулевой уровень («бланк») по лунке А1.

Результаты ИФА учитываются при следующих условиях:

среднее значение $ОП_{K+}$ – не менее 0,60 ($ОП_{K+} \geq 0,60$);

среднее значение $ОП_{K+пор}$ – не менее 0,20 ($ОП_{K+пор} \geq 0,20$);

среднее значение $ОП_{K-}$ – не более 0,10 ($ОП_{K-} \leq 0,10$).

В противном случае исследование необходимо повторить.

Рассчитайте индекс позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на среднее значение $ОП_{K+пор}$:

$$ИП_{обр} = ОП_{образца} / ОП_{K+пор},$$

где $ОП_{образца}$ – оптическая плотность исследуемых образцов в рабочем разведении;

$ОП_{K+пор}$ – среднее значение оптической плотности контрольного образца уровня среза ($K^+_{пор}$).

Интерпретация результатов

Исследуемые образцы учитывать:

как положительные при $ИП_{обр}$ больше 1,1;

как отрицательные при $ИП_{обр}$ меньше 0,9.

Исследуемые образцы учитывать как сомнительные при $ИП_{обр}$ в диапазоне от 0,9 до 1,1, т.е. при $1,1 \geq ИП_{обр} \geq 0,9$.

Образцы, оцененные как сомнительные, должны быть исследованы повторно. При повторном получении сомнительных результатов рекомендуется дополнительное обследование пациента.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 13 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8 °С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производство имеет сертифицированную на соответствие требованиям международных стандартов ISO 9001:2015, ISO 13485:2003 систему менеджмента качества.

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к антигенам рода Кандида» "ИФА-Кандида-IgM", соответствует Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности (см. Сведения о нормативной документации).

По вопросам, касающимся качества и обращения набора "ИФА - Кандида - IgM", следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК, ekolab-sekretar@mail.ru.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе

С.Г.Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус

«14» 07 2017 г.

КРАТКАЯ СХЕМА ПОДГОТОВКИ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ("ИФА-Кандида-IgM")

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Предварительное разведение исследуемых образцов

Внести	в лунки <i>одного</i> вспомогательного планшета по 90 мкл РПРО и по 10 мкл исследуемых образцов (разведение в 10 раз)
---------------	---

Приготовление рабочих разведений исследуемых образцов

Внести	в лунки <i>другого</i> вспомогательного планшета по 60 мкл РПРО и по 75 мкл блокирующего раствора (БР), тщательно перемешать.
---------------	---

Внести	по 15 мкл предварительно разведенных в 10 раз образцов в каждую лунку, тщательно перемешать.
---------------	--

Инкубация	30 мин, 21-25 °С
------------------	------------------

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА ("ИФА-Кандида-IgM")

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Извлечь	рамку иммуносорбента и необходимое число стрипов
Внести	в лунку A1– 100 мкл РРО, в лунки B1, C1- по 100 мкл K ⁺ , в лунки D1, E1-по 100 мкл K ⁺ _{пор} в лунки F1,G1 –по 100 мкл K-, в остальные лунки – по 100 мкл рабочих разведений исследуемых образцов (см. Краткая схема подготовки исследуемых образцов)
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	во все лунки по 100 мкл конъюгата
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	по 100 мкл раствора индикаторного в каждую лунку
Инкубация	10-15 мин, 21-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по лунке с A1

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 2 ЛИСТОВ

« 11 » 07 2017 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Н.К.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

лист 06
Начальник ОНД ЗАО "ЭКОлаб"
Гашенко Т.Ю.

" 11 " 07 2017 г.